SNI 2332-11:2017

SNI

Standar Nasional Indonesia

Cara uji mikrobiologi - Bagian 11 : Konfirmasi *Salmonella* spp. dengan Teknik Reaksi Berantai Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) konvensional pada produk perikanan

ICS 67.120.30

Daftar isi

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan komoditas hasil perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan, yang telah dirumuskan melalui rapat teknis, dan rapat konsensus pada tanggal 21-23 September 2016 di Jakarta dihadiri oleh wakil dari produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 30 November 2016 sampai dengan 28 Januari 2017 dengan hasil akhir Rancangan Akhir Standar Nasional Indonesia (RASNI).

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari dokumen standar ini dapat berupa hak paten. Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab untuk pengidentifikasian salah satu atau seluruh hak paten yang ada.

Pendahuluan

Berkaitan dengan penyusunan RSNI ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah :

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
2. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 16 Tahun 2016 tentang Kriteria Mikrobiologi dalam Pangan Olahan.

Cara uji mikrobiologi : Konfirmasi *Salmonella* spp. dengan Teknik Reaksi Berantai Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) konvensional pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk melakukan konfirmasi *Salmonella* spp. menggunakan teknik reaksi berantai polymerase konvensional pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini berlaku.

2.1

asam deoksiribonukleat
***deoxyribonucleic acid* / DNA**
suatu asam nukleat yang menyimpan segala informasi biologis yang unik dari setiap makhluk hidup

2.2

Ekstraksi asam deoksiribonukleat
suatu proses isolasi asam deoksiribonukleat dari isolat *Salmonella* spp.

2.3

reaksi berantai polimerase
***Polymerase Chain Reaction*/PCR**
suatu teknik dalam biologi molekuler untuk memperbanyak (replikasi) asam deoksiribonukleat secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu

2.4

elektroforesis
teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan

2.5

gen *InvA*
gen lestari (*conserved gene*) yang terdapat pada bakteri *Salmonella* spp.

2.6

isolat *Salmonella* spp.
isolat hasil isolasi pada media selektif *Salmonella* spp yang merupakan koloni tipikal atau atipikal yang berumur maksimal 24 jam

2.7
produk perikanan
ikan termasuk biota perairan yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir lainnya berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.8
***Salmonella* spp.**
bakteri gram negatif, berbentuk batang tanpa spora dengan ukuran 0,7 µm – 1,5 µm x 25 µm. *Salmonella* umumnya memiliki *peritrichous flagella*, kecuali *Salmonella pullorum* dan *Salmonella gallinarum*

3 Prinsip

Konfirmasi dari isolat *Salmonella* spp. hasil isolasi diawali dengan proses ekstraksi asam deoksiribonukleat genom, kemudian diperbanyak secara enzimatik berdasarkan perubahan suhu (amplifikasi) menggunakan *thermal cycler.* Setelah amplifikasi, produk reaksi berantai polimerase dipisahkan dengan elektroforesis dan divisualisasikan.

4 Peralatan

- Autoclave;
- Filter tip mikropipet 0,1 µL - 10 µL; 10 µL - 100 µL; 100 µL - 1000 µL;
- Freezer;
- Heating block (37ºC dan 70ºC);
- Jarum ose diameter 10 mm;
- Laminar air flow;
- Mikropipet 0,1 µL - 10 µL; 10 µL - 100 µL; 100 µL - 1000 µL;
- Mikro tube steril 0,2 mL; 1,5 mL - 2 mL;
- Peralatan gelas;
- Perangkat elektroforesis;
- Perangkat visualisasi (*gel documentation* dan *uv transillumination*);
- *Refrigerated centrifuge;*
- *Shaker waterbath* 37°C ± 1°C; kecepatan 170 rpm - 180 rpm;
- *Thermal cycler;*
- Timbangan dengan ketelitian 0,1 g;
- Vortex mixer.

5 Media

- Agarosa;
- Asam deoksiribonukleat gel stain;
- Asam deoksiribonukleat ladder;
- Elution buffer ;
- Ethanol absolute;
- Kontrol positif dan kontrol negatif;
- Lysis/binding buffer;
  - Media pertumbuhan cair (Trypticase (tryptic) Soy Broth/TSB atau media pertumbuhan cair lain yang sesuai);

- Media pertumbuhan padat (Trypticase (tryptic) Soy Agar/TSA atau media pertumbuhan padat lain yang sesuai);
- Master mix (enzim taq polimerase, dNTPs, MgCl2, Air bebas DNA dan RNA);
- Primer gen InvA (forward dan reverse) (Tabel 1);
- Proteinase K;
- rNase A;
- Tris Borate EDTA/TBE atau Tris Acetate EDTA/TAE buffer;
- Tris EDTA/TE buffer;
- Wash buffer.

Tabel 1 - Pasangan Primer Oligonukleotida (gen *InvA*) yang Digunakan untuk Amplifikasi Gen *Salmonella* spp.

Primer	Gen target	Sekuen Oligonukleotida	Ukuran amplikon (bp)	Referensi
139	*invA*	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	284	Rahn, *et.al,* 1992
141		TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		

6 Prosedur

6.1 Ekstraksi asam deoksiribonukleat genom

a) Ekstraksi asam deoksiribonukleat genom dapat dilakukan secara langsung atau tidak langsung. Ekstraksi langsung dilakukan dengan menggunakan isolat bakteri berumur maksimal 24 jam. Ekstraksi tidak langsung dilakukan jika isolat bakteri telah melebihi umur 24 jam sehingga perlu peremajaan.

b) Untuk ekstraksi langsung, ambil satu ose isolat *Salmonella* spp. untuk ditambahkan ke dalam 1,5 mL - 3 mL media *TE buffer*. Lanjutkan prosedur ke poin 6.1.d.

c) Untuk ekstraksi tidak langsung, ambil satu ose isolat *Salmonella* spp. dan diinokulasikan ke dalam 5 mL media pertumbuhan cair lalu inkubasikan di dalam *shaker waterbath* dengan kecepatan 170 rpm - 180 rpm pada suhu 37ºC ± 1ºC selama 18 jam - 24 jam. Sentrifugasi kultur pada suhu 20ºC - 23ºC dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Ambil pelet dan buang supernatan. Lanjutkan prosedur ke poin 6.1.d.

d) Lakukan ekstraksi asam deoksiribonukleat sesuai dengan prosedur yang tercantum pada kit ekstraksi komersial (*lysis/binding buffer, proteinase K, rNase A, wash buffer*) yang digunakan.

e) Resuspensi ekstrak asam deoksiribonukleat dalam 50 µL - 100 µL *TE buffer*. Jika tidak langsung dilakukan amplifikasi, asam deoksiribonukleat dapat disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20ºC.

6.2 Amplifikasi reaksi berantai polimerase

a) Siapkan *mastermix* dengan cara mencairkan ekstrak asam deoksiribonukleat, *primer* (*forward* dan *reverse*) dan reaksi berantai polimerase mix yang terdiri dari enzim *taq* polimerase, dNTPs, $MgCl_2$ dengan meletakkan di atas rak kemudian buat preparasi *mastermix* sesuai dengan Tabel 2. Siapkan volume *mastermix* n+1, (n= jumlah reaksi) lebih banyak dari yang dibutuhkan.
b) Homogenkan semua bahan *mastermix* dan distribusikan ke masing-masing tabung reaksi berantai polimerase.
c) Masukkan 1 µL asam deoksiribonukleat (10 pg - 1 µg) contoh uji ke dalam bahan master mix. Lakukan hal yang sama terhadap kontrol positif dan negatif.
d) Lakukan amplifikasi pada *thermal cycler* pada kondisi yaitu pra denaturasi (95ºC, 60 detik), denaturasi (95ºC, 30 detik), penempelan primer (64ºC, 30 detik), elongasi atau pemanjangan primer (72ºC, 30 detik) dan elongasi akhir (72ºC, 420 detik) dengan siklus sebanyak 35 kali.

Tabel 2 - Komposisi Reaksi Berantai Polimerase Mix, *Primer*, dan Ekstrak *DNA* Contoh untuk Konfirmasi *Salmonella* spp. dengan Teknik Reaksi Berantai Polimerase Konvensional

No.	Reagen	Volume untuk 1 reaksi (µL)
1.	Reaksi Berantai Polimerase Mix	0,5 dari total volume
2.	*Primer* (*Forward*) (0.1 µM - 1.0 µM)	1
3.	*Primer* (*Reverse*) (0.1 µM - 1.0 µM)	1
4.	Ekstrak DNA contoh uji (10 pg – 1 µg)	1
5.	Air bebas DNA dan RNA	sampai mencapai 25
	Total Volume	**25**

6.3 Elektroforesis dan Visualisasi

a) Siapkan 1,5 % - 2 % gel *agarosa* dengan cara mencampurkan *agarosa* dalam 1xbufer TBE/TAE sesuai dengan volume yang diperlukan. (Contoh : 0,06 gr *agarosa* di dalam 30 mL *TBE/TAE buffer*).
b) Larutkan *agarosa* dalam *buffer* tersebut dengan cara dipanaskan hingga larut sempurna.
c) Letakkan cetakan sumuran pada perangkat elektroforesis dan tambahkan larutan *agarosa*, biarkan memadat kemudian angkat cetakan sumuran sehingga diperoleh sumur tempat contoh uji.
d) Isi salah satu sumur pada gel dengan 3 µL - 5 µL asam deoksiribonukleat *ladder* 100*bp* kemudian isi sumur yang lain dengan 3 µL - 5 µL produk reaksi berantai polimerase yang telah diperoleh sebelumnya.
e) Jalankan perangkat elektroforesis pada 70 volt - 100 volt selama 30 menit.
f) Visualisasi dilakukan dengan mewarnai produk asam deoksiribonukleat dengan pewarna asam deoksiribonukleat *gel stain* (5 µL - 8 µL / 100 mL 1x bufer TBE/TAE).
g) Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan asam deoksiribonukleat *gel stain* selama 30 menit.

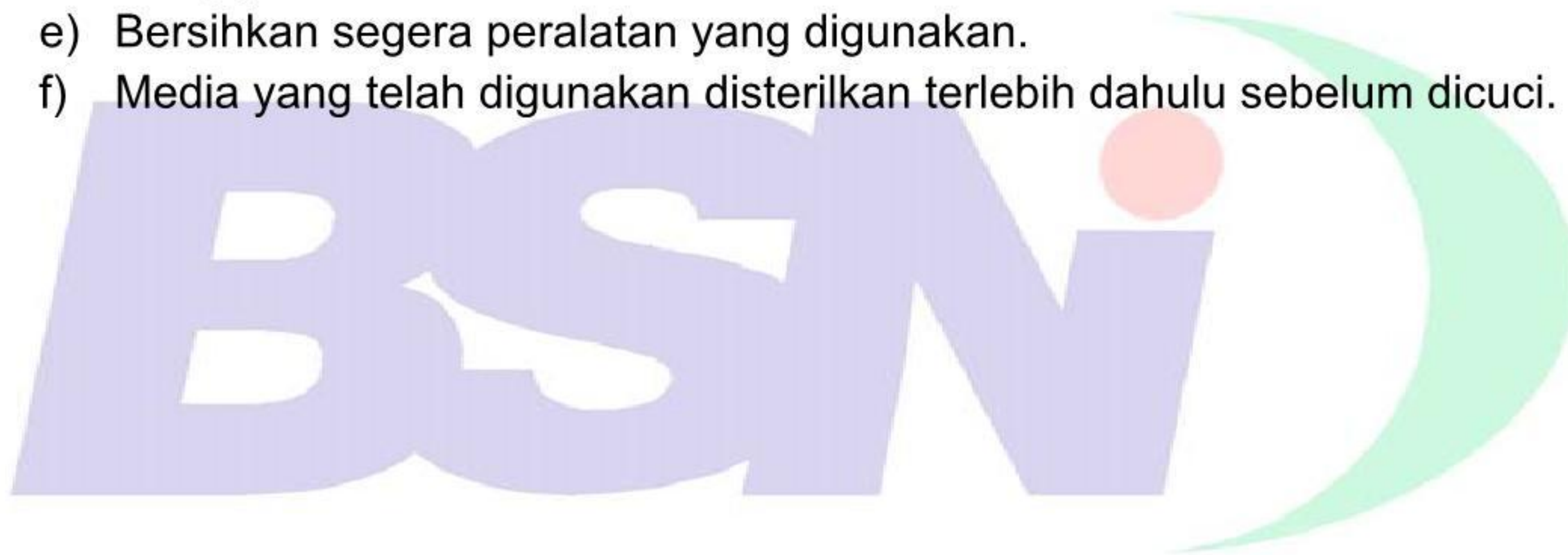
h) Amati gel di bawah sinar ultraviolet dengan menggunakan *Gel Documentation - UV Transiluminator*. Asam deoksiribonukleat *gel stain* dapat berinteraksi di antara pasangan basa pada asam deoksiribonukleat sehingga terlihat pita produk reaksi berantai polimerase.

6.4 Hasil Pengujian

Hasil pengujian secara kualitatif dinyatakan positif bila ditemukan pita produk reaksi berantai polimerase pada ukuran amplikon 284*bp*.

7 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut :

a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisis.
b) Gunakan sarung tangan dan jas laboratorium selama melakukan analisis.
c) Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisa.
d) Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan.
e) Bersihkan segera peralatan yang digunakan.
f) Media yang telah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dicuci.

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media

A.1 Media Pertumbuhan Cair

Trypticase (tryptic) Soy Broth

Tryptone	17	g
Phtone	3	g
NaCl	5	g
Di-potassium Phosphate (KH_2PO_4)	2,5	g
Glukosa	2,5	g
Akuades	1000	mL

Larutkan bahan dan didihkan. Sterilisasi pada suhu 121ºC selama 15 menit. Atur pH akhir (7,3 ± 0,2).

A.2 Media Pertumbuhan Padat

Trypticase (tryptic) Soy Agar

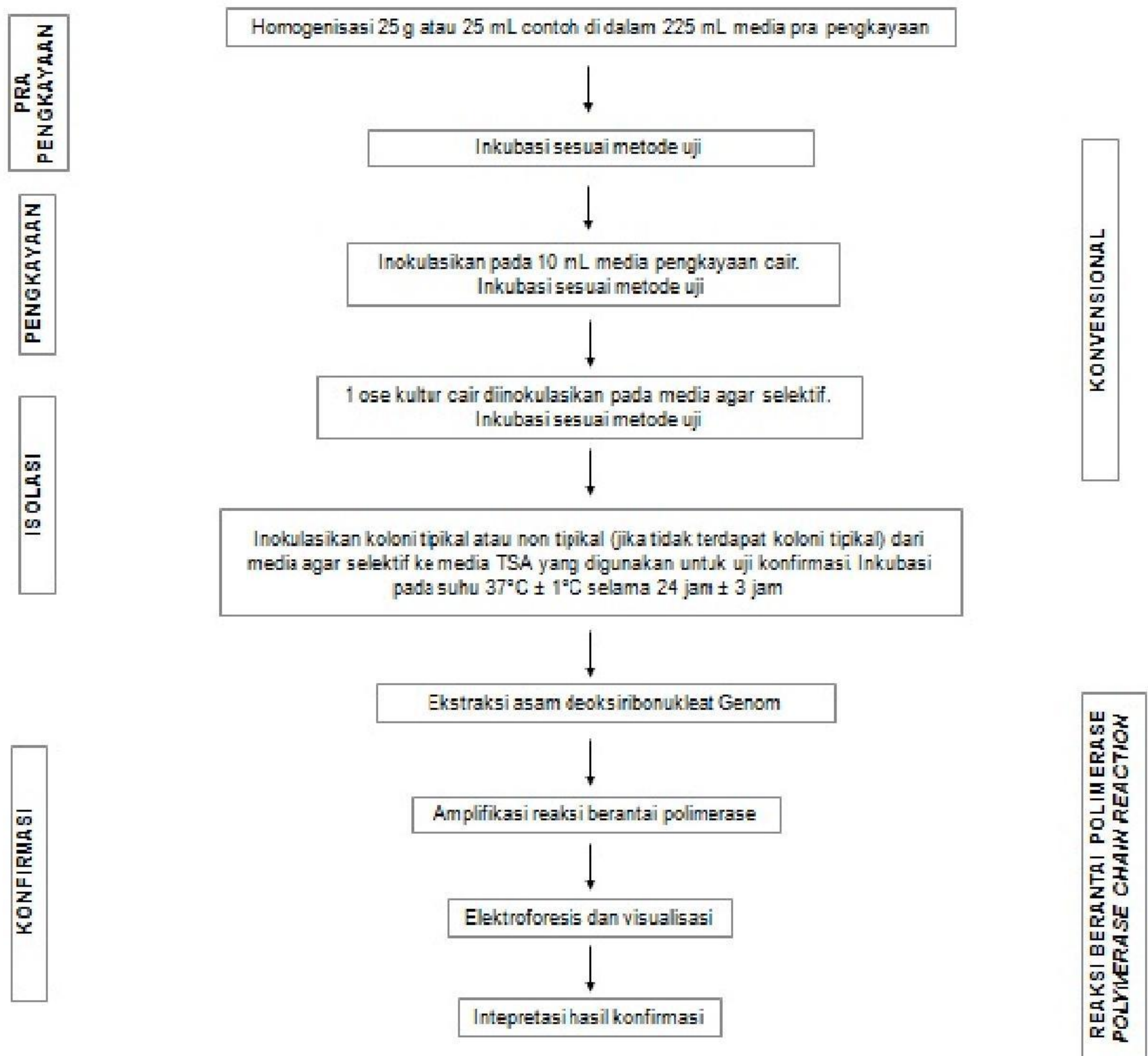
Trypticase peptone	15	g
Tryptone peptone	5	g
NaCl	5	g
Agar	15	g
Akuades	1000	mL

Larutkan semua bahan dan didihkan. Sterilisasi pada suhu 121ºC selama 15 menit. Atur pH akhir (7,3 ± 0,2).

A.3 Media 1XBufer Tris Borate EDTA/Tris Acetate EDTA

10x Bufer TBE atau	100	g
50x Bufer TAE	20	g
Akuades	1000	mL

Larutkan semua bahan dan sterilisasi pada suhu 121ºC selama 15 menit. Simpan pada suhu 20ºC - 25ºC

Lampiran B
(Informatif)
Skema Konfirmasi *Salmonella* spp. Menggunakan Teknik Reaksi Berantai Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) Konvensional pada Produk Perikanan

Gambar B.1 - Skema Konfirmasi *Salmonella* spp. Menggunakan Teknik Reaksi Berantai Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) Konvensional pada Produk Perikanan

Lampiran C
(Informatif)
Verifikasi Konfirmasi *Salmonella* spp. Menggunakan Teknik Reaksi Berantai Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) Konvensional pada Produk Perikanan

HASIL VERIFIKASI

Tabel C.1 – Hasil Pengujian Verifikasi *Salmonella* spp. dengan Teknik Reaksi Berantai Polimerase Konvensional Menggunakan Contoh Ikan Tuna

No.	Nama Contoh Uji	Jumlah Koloni Ditambahkan (koloni/ml)	Hasil Pengujian Reaksi Berantai Polimerase
1.	Contoh 1	1	Positif
2.	Contoh 2	1	Positif
3.	Contoh 3	1	Positif
4.	Contoh 4	1	Positif
5.	Contoh 5	1	Positif
6.	Contoh 6	1	Positif
7.	Contoh 7	1	Positif
8.	Contoh 8	10	Positif
9.	Contoh 9	10	Positif
10.	Contoh 10	10	Positif
11.	Contoh 11	10	Positif
12.	Contoh 12	10	Positif
13.	Contoh 13	10	Positif
14.	Contoh 14	10	Positif
15.	Contoh 15	0	Negatif
16.	Contoh 16	0	Negatif
17.	Contoh 17	0	Negatif
18.	Contoh 18	0	Negatif
19.	Contoh 19	0	Negatif
20.	Contoh 20	0	Negatif
21.	Contoh 21	0	Negatif

EVALUASI HASIL VERIFIKASI

Tabel C.2 – Evaluasi Hasil Verifikasi

Metode Uji Reaksi Berantai Polimerase Konvensional		**Jumlah Hasil Uji Presumtif**		**Jumlah**
		Positif (+)	**Negatif (-)**	
Hasil Uji (Konfirmatif)	**Positif (+)**	14 (A)	0 (C)	14
	Negatif (-)	0 (B)	7 (D)	7
Jumlah Uji		14	7	21

Perhitungan :

Sensitivitas : $\frac{A}{(A+B)} = \frac{14}{14} \times 100\% = 100\ \%$

Spesivitas : $\frac{D}{(C+D)} = \frac{7}{7} \times 100\% = 100\ \%$

False Negative rate : $\frac{C}{(A+C)} = \frac{0}{14} \times 100\% = 0\ \%$

False Positive rate : $\frac{B}{(B+D)} = \frac{0}{7} \times 100\% = 0\ \%$

Bibliografi

[1] ISO 6579:2002, *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp*.

[2] P3DSPTSPBKP dan PPISHP DKI Jakarta, 2016. Laporan verifikasi metode pengujian *Salmonella* spp. dengan teknik reaksi berantai polimerase konvensional.

[3] Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, R. Curtiss and C. L. Gyles, (1992).*Amplification of an invA gene sequence of Salmonalla typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol. Cell. Probes., 6:* 271- 279.

Informasi pendukung terkait perumus standar

[1] Komite Teknis Perumus SNI
Komite Teknis 65-05 Produk Perikanan

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis perumus SNI

Ketua	:	Artati Widiarti	Kementerian Kelautan dan Perikanan
Wakil Ketua	:	Widya Rusyanto	Kementerian Kelautan dan Perikanan
Sekretaris	:	Nurjanah	Yayasan Lembaga Konsumen Indonesia (YLKI)
Anggota	:	Lili Defi Z	Dit. Standardisasi Produk Pangan, BPOM
Anggota	:	Ai Zairin	PT Inti Samudra Hasilindo
Anggota	:	Hantowo Tjhia	Asosiasi Pengolahan dan Pemasaran Produk Perikanan Indonesia (AP5i)
Anggota	:	Murtiningsih	Kementerian Kelautan dan Perikanan
Anggota	:	Bagus Sediadi Bandol Utomo	Kementerian Kelautan dan Perikanan
Anggota	:	Tengku A.R. Hanafiah	Masyarakat Standardisasi (MASTAN)
Anggota	:	Ahmad Muhamad Mutaqin	Kementerian Kelautan dan Perikanan
Anggota	:	Harsi Dewantari Kusumaningrum	Institut Pertanian Bogor (IPB)
Anggota	:	Adi Surya	Asosiasi Pengalengan Ikan Indonesia (APIKI)
Anggota	:	Tri Winarni Agustini	Universitas Diponegoro
Anggota	:	Santoso	Sekolah Tinggi Perikanan
Anggota	:	Mufidah Fitriati	Komisi Laboratorium Pengujian Pangan Indonesia

[3] Konseptor rancangan SNI
Yenni Yusma – Pusat Penelitian dan Pengembangan Daya Saing Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (P3DSPBKP)
Tri Kukuh Wahyudi – Pusat Produksi Inspeksi dan Sertifikasi Hasil Perikanan (PPISHP) DKI

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis perumus SNI
Direktorat Bina Mutu dan Diversifikasi Produk Perikanan
Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan
Kementerian Kelautan dan Perikanan